

气态甲醛对人体颊黏膜细胞遗传毒性的研究

鲁志松, 严彦, 乔琰, 姚汉超, 杨旭* (华中师范大学生命科学学院, 湖北 武汉 430079)

摘要: 以人体颊黏膜细胞作为实验材料, 以彗星实验为终点效应, 采用仿真式的气体灌流进行体外实验, 对气态甲醛遗传毒性进行了探讨. 结果显示气态甲醛染毒 1h, 甲醛在 $0.5\text{mg}/\text{m}^3$ 和 $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ 时具有断裂作用, 在 $3.0\text{mg}/\text{m}^3$ 时则具有明显交联作用. 这表明气态甲醛的遗传毒性在高浓度($3.0\text{mg}/\text{m}^3$)时可能会提高癌症发生的几率.

关键词: 气态甲醛; 遗传毒性; 人体颊黏膜细胞; 彗星实验; 体外实验

中图分类号: X18 文献标识码: B 文章编号: 1000-6923(2003)06-0566-04

Studies on genotoxicity of gaseous formaldehyde on human buccal cells. LU Zhi-song, YAN Yan, QIAO Yan, YAO Han-chao, YANG Xu (College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China). *China Environmental Science*, 2003,23(6): 566~569

Abstract: Taking human buccal cells as testing material to study genotoxicity of gaseous formaldehyde with comet test as destination effect, and adopting gas pouring flow of imitation type for the test *in vitro*. At $0.5\text{mg}/\text{m}^3$ and $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ formaldehyde possesses breaking action when it has been toxicity-contaminated for 1h; and at $3.0\text{mg}/\text{m}^3$ possesses obvious cross-link action. This indicates that formaldehyde could increase the possibility of cancer at high levels.

Key words: gaseous formaldehyde; genotoxicity; human buccal cells; comet test; test *in vitro*

甲醛是一种常见的室内空气污染物, 不同浓度的甲醛可以诱导多种类的细胞产生突变, 这种突变可能是点突变, 也可能是大段 DNA 片段的改变, 包括染色体的断裂, 姐妹染色单体的交换, DNA-DNA, DNA-蛋白质分子交联等^[1].

以甲醛遗传毒性作用的靶细胞——人类颊黏膜细胞作为实验材料, 运用彗星实验研究了气态甲醛对人体细胞的遗传毒性.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

WH-2 型小型智能环境气候舱(武汉市宇信科技开发有限公司); 8.4L 通气式干燥器; 4160-2 型甲醛测定仪(美国 INTERSCAN 公司); DYY-III 型电泳槽(北京市六一仪器厂); DYY-11B 型三恒电泳仪(北京市六一仪器厂); 低温冷冻离心机(SIGMA); BH-2 型荧光显微镜(OLYMPUS); 0.635cm 150 万像素 CCD(SONY). 吡啶橙(A.O); 正常熔点琼脂糖(NMA); 低熔点琼脂糖(LMA); 生理盐水(0.9% NaCl 溶液).

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的收集 受试者为一健康成年男子. 每次取细胞前, 先用清水漱口 3 次, 然后用软毛牙刷轻刷口腔两侧颊部黏膜, 接着用 10mL 生理盐水漱口, 收集漱口水, 定容为 20mL^[2].

1.2.2 细胞的仿真式染毒 将 20mL 的生理盐水与 20mL 细胞悬液分别装于两个一样大小的平皿中, 置于用 8.4L 通气式干燥器改装的染毒缸中. 用于染毒的甲醛气体采用仿真式方案制备, 即将木质板材放在 WH-2 型小型智能环境气候舱内, 调节板材的数量, 使舱持续稳定的输出一定浓度的甲醛气体. 舱内气温为 $23\pm 0.5^\circ\text{C}$, 舱内湿度为 $45\%\pm 5\%$, 过舱气流量为 1L/min. 采用 $0.5, 1.0, 3.0\text{mg}/\text{m}^3$ 气态甲醛分别染毒 60min, 同时设一空白对照组^[3].

1.2.3 仿真式染毒甲醛浓度的测定 甲醛浓度用 4160-2 型甲醛测定仪测定, 灵敏度为 $0.012\text{mg}/\text{m}^3$,

收稿日期: 2003-04-14

基金项目: 国家“十五”科技攻关课题(2001BA704B01)

* 通讯联系人

准确度为 $\pm 0.024\text{mg}/\text{m}^3$ 。

1.2.4 甲醛的水溶性实验 采用 AHMT 比色法^[4]测定生理盐水中的甲醛浓度。

1.2.5 颊黏膜细胞的彗星实验 在完全磨毛的载玻片(75mm×25mm)上铺第一层 150 μL 质量分数为 1%的正常熔点琼脂糖(NMA),待其固化后铺第二层 50 μL 质量分数为 0.8%的低熔点琼脂糖(LMA)和 30 μL 细胞悬液的混合液,第二层固化后铺第三层 85 μL 质量分数为 0.5%的 LMA。固化条件均为 4 $^{\circ}\text{C}$, 10min。将制好的凝胶放入冷的裂解液(2.5mol/L NaCl, 100mmol/L Na_2EDTA , 10mmol/L Tris, 1%十二烷基肌氨酸钠, 1% Triton X-100, 10% DMSO)中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解 2h。然后放入蒸馏水中漂洗 3min,待凝胶略干时,向每一凝胶上滴加 120 μL 10mg/mL 的蛋白酶 K,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2h。将载玻片取出,在 0.4mol/L Tris (pH= 7.5)中浸泡 3min,晾干。将新配制的电泳缓冲液倒入电泳槽中,约覆盖过载玻片 0.25cm,盖上盖子, pH=13 的电泳缓冲液(1mmol/L Na_2EDTA , 300mmol/L NaOH)中放置 20min 以便双链 DNA 解螺旋。室温下调节缓冲液液面高低,21V, 240mA 下电泳 20min。将凝胶浸入 0.4mol/L Tris 缓冲液(pH7.5)中,浸洗 30min。用 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的吖啶橙染色 5min,双蒸水洗掉表面的染料,24h 内在荧光显微镜下观察^[2,5]。

1.3 实验数据的统计分析

对每一浓度的 50 个细胞的迁移率进行分析。细胞由 CCD 拍摄,在电脑上用 CASP 彗星图象分析软件自动分析。分析指标为国际公认的 Tail Moment 和 Tail DNA%。实验测得的各项数据用 SigmaPlot2001 统计软件分析。

2 结果与分析

2.1 仿真式染毒气体甲醛浓度

表 1 为舱输出气体的甲醛浓度测定值。实际染毒的 3 个甲醛剂量为 0.47 ± 0.05 , 1.00 ± 0.04 , $2.99\pm 0.19\text{mg}/\text{m}^3$,与设定的浓度 0.5,1.0,3.0 mg/m^3 非常吻合。这说明舱提供的染毒气体甲醛是稳定可靠的。

表 1 舱输出气体的甲醛浓度测定值

Table 1 The measurement results of formaldehyde concentrations from chamber emission

时间 (min)	甲醛浓度(mg/m^3)		
	第 1 次染毒	第 2 次染毒	第 3 次染毒
0	0.525	1.038	2.975
30	0.450	1.013	2.800
60	0.438	0.963	3.188
平均值 \pm 标准差	0.47 ± 0.05	1.00 ± 0.04	2.99 ± 0.19

2.2 甲醛的水溶性实验结果

采用 AHMT 比色法对经仿真式甲醛染毒的生理盐水进行测定,设 2 个平行样,结果见表 2。

表 2 仿真式染毒生理盐水中甲醛浓度测定值

Table 2 The measurement results of formaldehyde concentrations in 0.9% NaCl solution

样品	甲醛浓度(mg/L)		
	0.5 mg/m^3 组	1.0 mg/m^3 组	3.0 mg/m^3 组
A	0.155	0.287	0.727
B	0.139	0.282	0.721
平均值	0.147	0.285	0.724

由表 2 可见,甲醛在生理盐水中蓄积的浓度随灌流气态甲醛浓度的增加而升高。不同浓度下,生理盐水中甲醛的终浓度分别为 4.85, 9.4, 23.89 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。计算 3 个染毒组的蓄积倍数如下:

$$\text{蓄积倍数} = \frac{\text{生理盐水中甲醛终浓度}(\text{mg}/\text{L}) \times 1000}{\text{染毒气态甲醛浓度}(\text{mg}/\text{m}^3)}$$

0.5,1.0,3.0 mg/m^3 组蓄积倍数分别为 294, 285, 241。

2.3 颊黏膜细胞的彗星实验

由图 1 可见,当气态甲醛浓度为 0.5 mg/m^3 时,Tail Moment 和 Tail DNA%与对照组相比均有极显著的提高($P<0.01$)。当气态甲醛浓度为 1.0 mg/m^3 时,Tail Moment 和 Tail DNA%虽较 0.5 mg/m^3 时有一定程度的下降,但与对照组相比仍有极显著的提高($P<0.01$)。这说明在较低的浓度水平时,气态甲醛可以导致 DNA 链断裂。而当气态甲醛浓度为 3.0 mg/m^3 时,Tail Moment 和 Tail DNA(%)与对照组相比无显著差异。这说明在

3.0mg/m³的水平下,气态甲醛引起了交联作用.

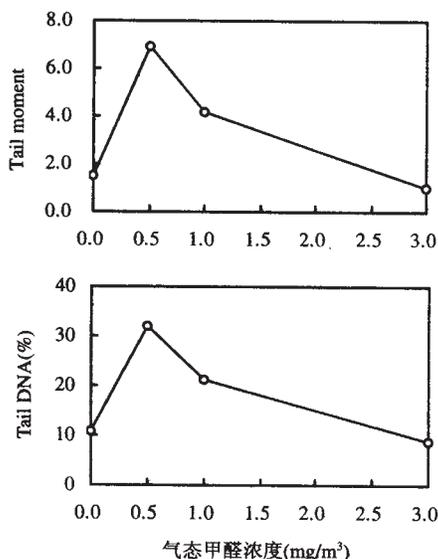


图1 气态甲醛体外染毒人体颊黏膜彗星实验结果
Fig.1 The test results of comet assay of human buccal cells exposed to gaseous formaldehyde

3 讨论

3.1 气态甲醛与口腔颊黏膜细胞彗星实验

口腔颊黏膜是环境甲醛的接触部位,人体颊黏膜细胞是甲醛遗传毒性的靶细胞之一.人体颊黏膜细胞彗星实验灵敏、快速、无创,可以广泛运用于各种气态污染物遗传毒性的环境监测和人群流行病学研究.

3.2 甲醛引起的断裂作用和交联作用

甲醛具有诱导 DNA-DNA, DNA-蛋白质分子交联的作用,而且这种作用在各种类型的细胞中都有发现.Oliver Merk^[6,7]等对甲醛的遗传毒性作了多次研究,没有观察到甲醛具有断裂作用.国内多数研究也没有发现甲醛的 DNA 断裂作用^[8].唐国慧^[9](HL60 人白血病细胞)和裘著革^[10](大白鼠肝细胞)发现当甲醛浓度为 5,10 μ mol/L 时均可以导致 DNA 链发生断裂.在作者的另一项研究中,发现甲醛在 5,7.5,10 μ mol/L 时均能引起 DNA 链断裂作用的发生,且甲醛断裂的峰值浓度位于 7.5 μ mol/L 左右.

在 0.5,1.0mg/m³ 的气态甲醛作用下,DNA 发生了断裂.证明甲醛确实具有断裂作用.通过水溶性实验,可知在 0.5,1.0mg/m³ 时,甲醛在生理盐水中的终浓度为 4.85,9.4 μ mol/L.这两个浓度均在甲醛的断裂浓度范围之内,因此气态甲醛的实验结果与早期进行的液态甲醛实验结果完全吻合.由此,可以认为甲醛兼具断裂和交联作用.

3.3 气态甲醛与液态甲醛的遗传毒性

甲醛在生理盐水中蓄积的浓度随灌流气态甲醛水平的升高而升高,且蓄积倍数为 241~294.经 0.5,1.0mg/m³ 染毒后,甲醛在生理盐水中的终浓度为 4.85,9.4 μ mol/L,导致 DNA 分子断裂.经 3.0mg/m³ 染毒后,甲醛在生理盐水中的终浓度为 23.89 μ mol/L,引起了 DNA 分子的交联.这与作者在液态甲醛中发现的 DNA 断裂与交联浓度范围一致.甲醛的水溶性实验为气态甲醛和液态甲醛遗传毒性的比较提供了一定的标准,能够在气态甲醛的浓度与液态甲醛的遗传毒性之间建立一定的联系.

3.4 职业暴露最高容许浓度安全性的探讨

0.5mg/m³ 气态甲醛可以引起 DNA 分子断裂;而当浓度升至 1.0mg/m³ 时,气态甲醛仍以断裂作用为主,伴有少量交联发生;当气态甲醛达到 3.0mg/m³ 时,产生严重的交联作用.在我国新颁布的职业卫生标准中,甲醛最高容许浓度为 0.5mg/m³^[11],该水平下甲醛以 DNA 断裂作用为主,在机体正常修复机制的作用下较为安全.从遗传毒性的角度去看,新的甲醛职业暴露最高容许浓度是合理的.

4 结语

采用仿真式染毒技术,对木质人造板材释放气体的遗传毒性进行了研究.结果表明,0.5mg/m³ 气态甲醛可以引起 DNA 分子的断裂;而当浓度升至 1.0mg/m³ 时,气态甲醛仍以断裂作用为主有少量交联发生;当气态甲醛达到 3.0mg/m³ 时,产生严重的交联作用.且与对照组之间具有极显著性差异($P < 0.01$).染毒过程中甲醛气体可以通过

生理盐水的吸收产生高浓度的蓄积(蓄积倍数为 241~294),从而引起人体颊黏膜细胞的损伤.

参考文献:

- [1] World Health Organization. Concise international chemical assessment document 40: formaldehyde [EB/OL]. http://www.who.int/pcs/cicad/full_text/cicad40.pdf, 2002-11-28.
- [2] Kaya E, Nurdan O, Semra S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine [J]. Clin. Oral. Invest., 2002,6:150-154.
- [3] 李睿,杨旭,陈茂林,等.体内和体外实验的动态气体灌流染毒装置 [J]. 中国卫生工程学, 2003,2(1):33-35.
- [4] 崔九思.室内空气污染监测方法 [M]. 北京:化学工业出版社, 2002.306-310.
- [5] Rojas E, Valverde M, Sordo M, *et al.* DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay [J]. Mutation Research, 1996,370:115-120.
- [6] Merk O, Speit G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis [J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 1998,32:260-268.
- [7] Speit G, Schutz P, Merk O. Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines [J]. Mutagenesis, 2000,15(1):85-90.
- [8] 张遵真,衡正昌.甲醛和丝裂霉素 C 的 DNA 交联作用研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2001,13(2):74-77.
- [9] 唐国慧,王俊南,庄志雄,等.甲基叔丁醚及其代谢产物对 HL-60 细胞的遗传毒性测定 [J]. 中华预防医学杂志, 1997,31(6):334-337.
- [10] 杨丹凤,裘著革,张华山,等.典型醛类污染物单独及联合作用对小鼠脾淋巴细胞 DNA 损伤的离体实验研究 [J]. 卫生研究, 2000,29(1):30-32.
- [11] GBZ 2-2002, 中华人民共和国国家职业卫生标准 [S].

作者简介: 鲁志松(1979-),男,湖北武汉人,华中师范大学生命科学学院在读硕士生,主要从事环境医学和分子生物学方面研究.

致谢: 武汉市疾病预防控制中心陈文革主管技师测定了生理盐水中甲醛的浓度;Zbigniew Koza, Andrzej Wojcik 和 Krzysztof Konca 3 位博士提供了 CASP 彗星分析软件.在此一并表示感谢.

欧洲联盟计划成立疾病预防控制中心

全球人群健康威胁如非典型肺炎(SARS)和西尼罗河病毒推动了欧洲联盟(EU)建立一个自己的疾病预防控制中心(ECDC)的计划.欧洲委员会(EC)已支持这一计划,现在等待欧洲议会的批准.该中心旨在更有效地协调 15 个国家公共卫生系统对传播性疾病的反应.EC 卫生委员 David Byrne 竭力支持这一计划,他说:“我们是在用 19 世纪的机制对付 21 世纪的威胁.”

成立这样一个中心讨论已久,大多数官员倾向于成立一个网络而不是一家实体中心,但现在情况有变.一家法国公共卫生机构 InVS 负责人 Gilles Br eker 说:“这样一个中心需要有一个地址,一位负责人和一批专家.”该中心不会聘用大批疾病专家,但能在需要时迅速将他们集合.该中心还将成为信息交流中心.

目前该计划要求有 100 名人员,2005 年经费约 640 万美元,到 2007 年增加到 3340 万美元,这和美国的疾病预防控制中心(CDC)相比显得太小,CDC 有 8500 名人员,经费 65 亿美元.CDC 支持这一计划.

江 年 摘自《Science》, August 1,581 (2003)